

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-191020

(43)Date of publication of application : 28.07.1995

(51)Int.Cl.

G01N 33/49

G01N 21/78

G01N 31/22

G01N 33/52

G01N 33/92

(21)Application number : 05-329407

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 27.12.1993

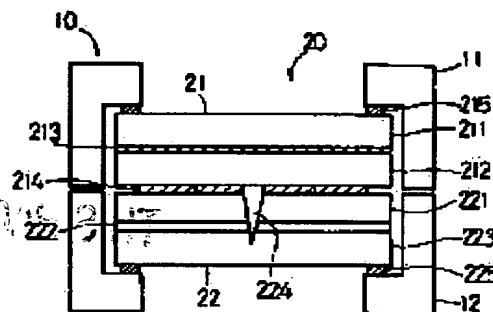
(72)Inventor : KITAJIMA MASAO

(54) METHOD FOR ANALYZING WHOLE-BLOOD SAMPLE USING WHOLE-BLOOD ANALYZING ELEMENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To determine a material to be inspected contained in a blood plasma by using an extremely small amount of whole-blood sample by successively supplying the whole-blood sample and a shifting-to-plasma accelerating liquid to a whole-blood analyzing element which is composed of a blood capsule separating element and blood plasma receiving element and does not contain any measuring reagent after the whole-blood sample.

CONSTITUTION: Grooves 224 formed by using a thermally melting blade are formed in a grid-like state on the blood plasma receiving element 22 of a dry analyzing element 20 and the element 20 is housed in the lower lid part 12 of a sliding frame 10, with the element 22 being thermally melt-stuck to four corners of the frame 10 with an adhesive 225 by using an ultrasonic phone. The blood capsule separating element 21 of the analyzing element 20 is also thermally melt-stuck to the four corners of the upper lid section 11 of the frames 10 with an adhesive 215 by using an ultrasonic phone. The separating element 21 is thermally melt-stuck to the receiving element 22 with an adhesive 214. Then a whole-blood sample and shifting-to-plasma accelerating liquid are successively supplied to the analyzing element 20 containing no measuring reagent and, after the plasma part of the sample penetrates into and is diffused in the receiving element 22, the elements 21 and 22 are separated from each other and the element 22 is dried. After drying, a measuring reagent solution is supplied to the element 22 and a material to be inspected is measured.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-191020

(43) 公開日 平成7年(1995)7月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/49		A		
21/78		B		
31/22	1 2 1	G		
33/52		B		
33/92		A		

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願平5-329407	(71) 出願人	000005201 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地
(22) 出願日	平成5年(1993)12月27日	(72) 発明者	北島 昌夫 埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 田中 政浩 (外1名)

(54) 【発明の名称】 全血分析要素を用いた全血試料の分析方法

(57) 【要約】

【目的】 極く少量の全血試料を用いて血漿に含まれている被検物質を定量しうる分析方法を提供する。

【構成】 全血試料、次いで血漿移行促進液を血球分離要素と血漿受容要素からなり測定試薬を含んでいない全血分析要素に供給し、該試料の血漿部分が血漿受容要素に浸透・拡散後血球分離要素と血漿受容要素とを分離し次に血漿受容要素を乾燥し、その後測定試薬溶液を該血漿受容要素に供給して被検物質を測定する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 全血試料、次いで血漿移行促進液を血球分離要素と血漿受容要素からなり測定試薬を含んでいない全血分析要素に供給し、該試料の血漿部分が血漿受容要素に浸透・拡散後血球分離要素と血漿受容要素とを分離し次に血漿受容要素を乾燥し、その後測定試薬溶液を該血漿受容要素に供給して被検物質を測定することを特徴とする全血分析要素を用いた全血試料の分析方法。

【請求項2】 請求項1において、血漿受容要素が複数の区画に分離されていることを特徴とする全血試料の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、測定試薬を含まない全血分析要素を用いた全血試料の分析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 血液、尿等を検体として人の病気を診断する方法は長く行われている。

【0003】 この方法の一つとして、ウェットケミストリー分析法がある。これは、いわゆる溶液試薬を用いる方法であって歴史も古く、多数の項目について検出試薬も開発されており、測定機も簡易小型機から大型全自動機まで各種ある。ウェットケミストリーに使用される検体は、血漿、血清、尿等であって、通常全血をそのまま検体として使用することはない。

【0004】 一方、定性・定量分析に必要な全ての試薬を試薬紙や多層分析フィルムのような分析要素の中に組み込んだ、いわゆるドライケミストリー分析要素が多数開発・商品化され、富士ドライケム（富士写真フイルム（株）製）、エクタクム（米国、イーストマンコダック社製）、ドライラボ（コニカ（株）製）、スポットケム（京都第一化学（株）製）、レフロトロン（独国、ペーリンガーマンハイム社製）、セラライザー（米国、マイルズラボラトリー社製）等の名称で市販されている。

【0005】 これらドライケミストリー分析要素は、下記のような特徴を有する。

(1) 分析に必要な試薬が全て分析要素の中に組み込まれている。

(2) 検体（通常は血清、血漿、尿、1部項目については全血）を点着するだけで分析に必要な反応を起こす。

【0006】 従来、湿式法、乾式化学分析いずれにおいても、赤血球を除去した血清または血漿を試料として分析が行なわれることが多かった。しかし、血液の他の成分から赤血球を分離する操作には多くの労力と装置のコストを伴うので、全血で分析できることが望ましい。

【0007】 全血を試料として乾式化学分析を行うには、血球（赤血球及び白血球）及び全血の他の有形成分を分析要素中で何らかの手段で分離しなければならない。その手段のひとつに多層分析要素内に血球分離要素

を設ける方法がある。この血球分離要素にはガラス繊維、メンブランフィルター、綿ウール繊維製品等を使用することが特開昭57-53661号公報、特開昭61-96466号公報等に開示されている。また、2層以上を組合せることも知られており、特開昭62-138756号公報、特開平3-16651号公報等には繊維質多孔性層と非繊維質多孔性層を組み合わせることが開示されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 乾式分析要素は検体を点着するだけで測定できる簡便さからその使用範囲が拡大してきており、測定機器を持たない開業医や小規模診療所でも被検者ないし患者から採血及び分析要素に点着を行なってこれを検査センターで測定を行なえる手段の開発が要望されるようになってきている。さらに在宅療養中の患者が自らあるいは看護者の手で採血及び点着を行なってこれを検査センターで測定を行なえるような手段が開発されれば在宅患者の検査を適格に行なうことができ、その利用価値は飛躍的に拡大する。

【0009】 この手段の開発には点着した全血検体の変質の防止等種々の問題点を開発しなければならないが、そのひとつに採血量の問題がある。すなわち、患者や採血に不馴れな看護者が注射器を使って採血を行なうことは到底考えられず、現実に行ないうるのは簡単な採血器具を用いて指先とか耳たぶから採血を行なう方法である。このような場合に1回で採血しうる量は50 μ lが限度であり、30 μ l以下であることが望まれる。採血は患者、被検者に苦痛を与えるものであるから、1回の採血で必要な分析を行なえる手段の開発が望まれる。

【0010】 本発明の目的は、極く少量の全血試料を用いて血漿に含まれている被検物質を定量しうる分析方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】 本発明は、上記目的を達成した全血試料の分析方法を提供するものであり、全血試料、次いで血漿移行促進液を血球分離要素と血漿受容要素からなり測定試薬を含んでいない全血分析要素に供給し、該試料の血漿部分が血漿受容要素に浸透・拡散後血球分離要素と血漿受容要素とを分離し次に血漿受容要素を乾燥し、その後測定試薬溶液を該血漿受容要素に供給して被検物質を測定することを特徴としている。

【0012】 血球分離要素としては、特開昭62-138756～8号公報、特開平2-105043号公報、特開平3-16651号公報等に記載された繊維質多孔性層と非繊維質多孔性層を部分的に配置された接着剤で接着（部分接着）一体化したもの、表面が親水化された弗素含有ポリマー、ポリスルホン等の血球分離能を有する微多孔性層等を使用できる。特に好ましいものは、血液点着側に繊維質多孔性層を配置し、血漿受容要素側に非繊維質多孔性層を配置して両者を後述の部分接着により一体化した血球分離要素である。

【0013】繊維質多孔性層と非繊維質多孔性層を部分的に配置された接着剤で接着（部分接着）一体化した血球分離要素における非繊維多孔性層としては、特公昭53-21677号、米国特許1,421,341号等に記載されたセルロースエステル類、例えば、ルロースアセテート、セルロースアセテート／ブチレート、硝酸セルロースからなるブラッシュポリマーの層が好ましい。6-ナイロン、6,6-ナイロン等のポリアミド、ポリエチレン、ポリプロピレン等の微多孔性膜でもよい。その他、特公昭53-21677号、特開昭55-90859号等に記載された、ポリマー小粒子、ガラス粒子、けい藻土等が親水性または非吸水性ポリマーで結合された連続空隙をもつ多孔性層も利用できる。

【0014】非繊維多孔性層の有効孔径は0.8～30 μ m、特に0.5～5 μ mであることが好ましい。本発明で非繊維多孔性層の有効孔径は、ASTM F316-70に準拠した限界泡圧法（バブルポイント法）により測定した孔径で示す。非繊維多孔性層が相分離法により作られたいわゆるブラッシュ・ポリマーから成るメンブランフィルターである場合、厚さ方向の液体通過経路は、膜の製造の際の自由表面側（即ち光沢面）で最も狭くなっているのが普通で、液体通過経路の断面を円に近似したときの孔径は、自由表面の近くで最も小さくなっている。容積の通過経路における厚さ方向に関する最小孔径は、さらにフィルターの面方向について分布を持っており、その最大値が粒子に対するろ（濾）過性能を決定する、通常、それは限界泡圧法で測定される。

【0015】上に述べたように、相分離法により作られたいわゆるブラッシュ・ポリマーから成るメンブランフィルターでは、厚さ方向の液体通過経路は膜の製造の際の自由表面側（即ち光沢面）で最も狭くなっている。本発明の分析要素の非繊維多孔性層としてこの種の膜を用いる場合には、支持体に近い側、即ち血漿受容要素に面する側に、メンブランフィルターの光沢面を向けることが好ましい。

【0016】繊維質多孔性層を構成する材料としては、濾紙、不織布、織物生地（例えば平織生地）、編物生地（例えば、トリコット編）、ガラス繊維濾紙等を用いることができる。これらのうち織物、編物等が好ましい。織物等は特開昭57-66359号に記載されたようなグロー放電処理をしてもよい。

【0017】繊維質多孔性層は、液体試料の展開層として利用されるので、液体計量作用を有する層であることが好ましい。液体計量作用とは、その表面に点着供給された液体試料を、その中に含有している成分を実質的に偏在させることなく、面の方向に単位面積当たりほぼ一定量の割合で広げる作用である。展開層には、展開面積、展開速度等を調節するため、特開昭60-222770号、特開昭63-219397号、63-112999号、62-182652号に記載したような親水性高分子あるいは界面活性剤を含有し

てもよい。

【0018】繊維質多孔性層の空隙体積（単位面積当たり。以下同じ）は非繊維質多孔性層と同じでもよいし、異なってもよい。両者の空隙体積の関係を調整するには、両者の空隙率または厚さを変えてもよいし、厚さと空隙率の両方を変えてもよい。

【0019】表面を親水化されており血球分離能を有する微多孔性層は、実質的に分析値に影響を与える程には溶血することなく、全血から血球と血漿を特異的に分離する。

【0020】その血球・血漿分離機構は明らかでないが、この微多孔性層はその表面のみで血球をトラップする訳ではなく、弗素含有ポリマーからなる微多孔性層と多孔性展開層をあわせた厚さ方向に浸透するに従って、初めは大きな血球成分、後には小さな血球成分と徐々に空隙構造にからめ、厚さ方向の全長にわたって血球を留め除去していく、いわゆる体積濾過作用によるものと思われる。

【0021】これらの弗素含有ポリマーの微多孔性層としては、特表昭63-501594(WO 87/02267)に記載のポリテトラフルオロエチレンのフィブリル（微細繊維）からなる微多孔性のマトリックス層（微多孔性層）、Gore-Tex(W. L. Gore and Associates社製)、Zite x (Norton社製)、ポアフロン（住友電工社製）などがある。その他に、US 3368872（実施例3及び4）、US 3260413（実施例3及び4）、特開昭53-92195(US 4201548)等に記載のポリテトラフルオロエチレンの微多孔性膜、US 3649505に記載のポリビニリデンフルオリドの微多孔性膜などがある。

【0022】これらの弗素含有ポリマーの微多孔性膜のうち、血球濾過層を構成する微多孔性層に特に適しているのは、孔径が実質的に赤血球を通さない程度に小さく、膜厚が薄く、空隙率が高いものである。具体的には、約0.2 μ mから約60 μ m、好ましくは約1 μ mから約20 μ mの範囲、更に好ましくは1～10 μ mの範囲、空隙率は約40%から約95%、好ましくは約50%から約95%、さらに好ましくは約70%から約95%の範囲、層の厚さは約10 μ mから約200 μ m、好ましくは約30 μ mから約150 μ m、製造工程中でのしわ発生等の取り扱い性を考慮すると、最も好ましくは約50 μ mから約120 μ mの範囲である。

【0023】これらの弗素含有ポリマーの微多孔性膜の作成に当たっては、1種もしくは2種以上の弗素含有ポリマーを混合しても良いし、弗素を含まない1種もしくは2種以上のポリマーや繊維と混合し、製膜したものであつても良い。

【0024】構造としては、延伸しないもの、1軸延伸したもの、2軸延伸したもの、1層構成の非ラミネートタイプ、2層構成のラミネートタイプ、例えば繊維等の他の膜構造物にラミネートした膜等がある。

【0025】フィブリル構造又は一軸延伸もしくは二軸延伸した非ラミネートタイプの微多孔性膜は、延伸により、空隙率が大きくかつ濾過長の短い微多孔膜が作られる。濾過長が短い微多孔膜では、血液中の有形成分（主として赤血球）による目詰りが生じがたく、かつ血球と血漿の分離に要する時間が短いので、定量分析精度が高くなるという特徴がある。

【0026】弗素含有ポリマーの微多孔性層は特開昭57-66359(US 4783315)に記載の物理的活性化処理（好ましくはグロー放電処理又はコロナ放電処理）を微多孔性層の少なくとも片面に施すことにより微多孔性層の表面を親水化して、隣接する微多孔性層との部分接着に用いられる接着剤の接着力を強化することができる。

【0027】弗素含有ポリマーの微多孔性膜は、そのままでは、表面張力が低く乾式分析要素の血球濾過層として用いようとしても、水性液体試料ははじかれてしまって、膜の表面や内部に拡散、浸透しないことは、周知の事実である。本発明の分析要素では、第1の手段として弗素含有ポリマーの微多孔性膜に親水性を付与し親水性を高める手段として、弗素含有ポリマーの微多孔性膜の外部表面及び内部の空隙の表面を実質的に親水化するに充分な量の界面活性剤を弗素含有ポリマーの微多孔性膜に含浸させることにより、前記の水性液体試料がはじかれる問題点を解決した。

【0028】水性液体試料がはじかれることなく膜の表面や内部に拡散、浸透、移送されるに充分な親水性を弗素含有ポリマーの微多孔性膜に付与するには、一般に、弗素含有ポリマーの微多孔性膜の空隙体積の約0.01%から約10%、好ましくは約0.1%から約5.0%、更に好ましくは0.1%から1%の界面活性剤で微多孔性膜の空隙の表面が被覆されることが必要である。例えば、厚さが50 μm の弗素含有ポリマーの微多孔性膜の場合に、含浸される界面活性剤の量は、一般に0.05g/m²から2.5g/m²の範囲であることが好ましい。弗素含有ポリマーの微多孔性膜に界面活性剤を含浸させる方法としては、界面活性剤の低沸点（沸点約50℃から約120℃の範囲が好ましい）の有機溶媒（例、アルコール、エステル、ケトン）溶液に弗素含有ポリマーの微多孔性膜を浸漬し、溶液を微多孔性膜の内部空隙に実質的に充分に行きわたらせた後、微多孔性膜を溶液から静かに引き上げ、風（温風が好ましい）を送り乾燥させる方法が一般的である。血球濾過層を構成する微多孔性層に含有させる前処理試薬等の成分とともに界面活性剤を弗素含有ポリマーの微多孔性膜に含有させることもできる。

【0029】弗素含有ポリマーの微多孔性膜を親水性化処理に用いられる界面活性剤としては、非イオン性（ノニオン性）、陰イオン性（アニオン性）、陽イオン性（カチオン性）、両性いずれの界面活性剤をも用いることができる。

【0030】これらの界面活性剤のうちでは、ノニオン

性界面活性剤が、赤血球を溶血させる作用が比較的低いので、全血を検体とするための多層分析要素においては有利である。ノニオン性界面活性剤としては、アルキルフェノキシポリエトキシエタノール、アルキルポリエーテルアルコール、ポリエチレングリコールモノエステル、ポリエチレングリコールジエステル、高級アルコールエチレンオキシド付加物（縮合物）、多価アルコールエステルエチレンオキシド付加物（縮合物）、高級脂肪酸アルカノールアミドなどがある。

10 【0031】ノニオン性界面活性剤の具体例として、次のものがある。

アルキルフェノキシポリエトキシエタノールとしては、イソオクチルフェノキシポリエトキシエタノール：

（Triton X-100：オキシエチレン単位平均9～10含有）

（Triton X-45：オキシエチレン単位平均5含有）
ノニルフェノキシポリエトキシエタノール：

（IGEPAL CO-630：オキシエチレン単位平均9含有）

20 （IGEPAL CO-710：オキシエチレン単位平均10～11含有）

（LENEX 698：オキシエチレン単位平均9含有）

アルキルポリエーテルアルコールとしては、

高級アルコール ポリオキシエチレンエーテル：

（Triton X-67：CA Registry No. 59030-15-8）

【0032】弗素含有ポリマーの微多孔性膜は、その多孔性空間に水不溶化した1種又は2種以上の水溶性高分子を設けることによって親水化したものであってもよい。水溶性高分子の例として、酸素を含む炭化水素にはポリビニルアルコール、ポリエチレンオキサイド、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、窒素を含むものにはポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアミン、ポリエチレンイミン、負電荷を有するものとしてポリアクリル酸、ポリメタアクリル酸、ポリスチレンスルホン酸などをあげることが出来る。不溶化は熱処理、アセタール化処理、エステル化処理、重クロム酸カリによる化学反応、電離性放射線による架橋反応等によって行えばよい。詳細は、特公昭56-2094号公報及び特公昭56-16187号公報に開示されている。

【0033】ポリスルホンの微多孔性膜は、ポリスルホンをジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドンあるいはこれらの混合溶媒等に溶解して製膜原液を作製し、これを支持体上に、又は直接凝固液中に流延し洗浄、乾燥して行うことにより製造することができる。詳細は特開昭62-27006号公報に開示されている。

50 ポリスルホンの微多孔性膜は、そのほか特開昭56-1264

0号公報、特開昭56-86941号公報、特開昭56-154051号公報等にも開示されており、それらも使用することができる。ポリスルホンの微多孔性膜も弗素含有ポリマーと同様界面活性剤を含有させ、あるいは水不溶化した水溶性高分子を設けることによって親水化することができる。

【0034】多孔性層は、血球分離要素から滲出してきた血漿部分を受容する層であり、例えば公知の展開層をこれに利用することができる。

【0035】展開層は、水性の検体に含有されている成分を実質的に偏在させることなしに平面的に拡げ、単位面積当たりほぼ一定量の割合で親水性ポリマー層に供給する機能を有する層であり、これまでドライケミストリー分析要素に使われている展開層として、公知の非繊維質及び繊維質の全ての多孔性材料を用いることができる。具体的には特開昭49-53888に開示されているメンブランフィルター(ブラッシュドポリマー)に代表される非繊維質等方的微多孔質媒体層、特開昭55-90859等を開示されたポリマーマイクロビーズが水不膨潤性の接着剤で点接触状に接着されて成る連続空隙含有三次元格子粒状構造物層に代表される非繊維性多孔性層、特開昭55-164356、同57-66359等を開示された織物布地からなる多孔性層、同60-222769等を開示された編物布地、各種の濾紙、親水性の紙などからなる層等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0036】展開層は、1層だけに限定する必要はなく、特開昭61-4959、同62-138756、同62-135757、同62-138758等を開示されている様に、2層以上の層を重ねて用いることができる。

【0037】展開層を2層以上重ねた多層分析要素については、検体の点着時には全層が積層一体化されている構成をとることが必須であるが、その後のプロセスでは一体化されている必要はない。必要に応じて、第一の展開層と第二の展開層の間を剥離した状態で使用することができる。

【0038】展開層中には、検体の展開を促進するために、ノニオン、アニオン、カチオンもしくは両性の界面活性剤を含ませることができる。また、展開性をコントロールする目的で、親水性のポリマー等の展開制御剤を含ませることができる。更に、目的とする検出反応を促進する為の、あるいは干渉、妨害反応を低減、阻止する為の各種試薬、もしくは試薬の1部を含ませることができる。

【0039】展開層の厚さは、10~500 μ m、好ましくは20~300 μ m、更に好ましくは30~200 μ mである。

【0040】展開層と血球分離要素の間は、血漿部分が拡散・浸透しうればよく、接着されていていなくてもよい。接着する場合には、血漿の拡散・浸透を阻害しないよう、いわゆる部分接着法により接着する。部分接着とは、特開昭61-4959(E P 0166365 A)、特開昭62-1

38756~138758(E P 0226465 A)等に記載の2つの隣接する多孔性層同士又は隣接する多孔性層と非多孔性層との接着の態様であって、『隣接する2層の界面の間に部分的(又は断続的)に配置された接着剤によって実質的に密着され一体化されており、かつ前記隣接する2面及びその間において液体の一樣通過が実質的に妨げられないように構成されている接着』である。

【0041】接着剤を血球分離要素あるいは多孔性層に部分的に配置する方法は特開昭61-4959、特開昭62-138756、特開昭64-23160(D E 3721236 A)等に記載の諸種の方法によることができる。それらの諸方法のうちでは印刷法による方法が好ましい。印刷法のうちで、接着剤を印刷版(グラビア印刷版又は凹版が好ましい)ローラーを用いて多孔性層又は検出機能層に転写し付着させる方法及び隣接する2層を貼りあわせる方法は、例えば、日本印刷学会編『印刷工学便覧』(技報堂出版(株)、1983年)839~853頁等に記載の公知の装置及び方法により実施することができる。

【0042】用いられる接着剤としては特開昭62-138756に記載の諸種の接着剤、そのほか前記の『印刷工学便覧』839~853頁等に記載の公知の接着剤を用いることができる。接着剤としては水溶媒型の接着剤、有機溶剤型の接着剤、熱接着性(又は感熱性)接着剤を用いることができる。水溶媒型の接着剤の例として、澱粉糊等の水性の糊;デキストリン、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール等の水溶液;酢酸ビニル-ブチルアクリレート共重合体エマルジョンがある。有機溶剤型の接着剤としては、溶剤の蒸発の遅いものが適する。熱接着性(又は感熱性)接着剤は特に有用である。

【0043】熱接着性(又は感熱性)のホットメルト型接着剤としては、『工業材料』26巻(11号)、4~5頁等に記載のホットメルト型接着剤を用いることができる。その例として、エチレン-酢酸ビニル共重合体、エチレン-アクリル酸エチル共重合体、エチレン-アクリル酸共重合体等のエチレン共重合体;低分子量ポリエチレンやアタクチックポリプロピレンのようなポリオレフィン類;ナイロン等のポリアミド;ポリエステル系共重合体;SBSなどのスチレンブロック共重合体のような熱可塑性ゴム;スチレンブタジエンゴム、ブチルゴム、ウレタンゴム;ロジン、石油樹脂、テルペン樹脂;合成ワックスがある。

【0044】これらの中で、シリコン系、アクリル系、フェノール樹脂系の感圧型接着剤が、本発明において特に有用である。

【0045】全血分析要素にはその他の層として通例、水不透透性支持体の上に少なくとも1層の親水性ポリマー層積層される。

【0046】親水性ポリマー層には、これまでドライケミストリー分析要素に使われている公知の水に可溶性、膨潤性、親水性の各種ポリマーを用いることができる。

水吸収時の膨潤率が30℃で約150%から約2000%、好ましくは約250%から約1500%の範囲の天然又は合成親水性ポリマーを使用することができ、具体的には、特開昭59-171864、同60-108753等に開示されたゼラチン（例えば、酸処理ゼラチン、脱イオンゼラチン等）、ゼラチン誘導体（例えば、フタル化ゼラチン、ヒドロキシアクリレートグラフトゼラチン等）、アガロース、プルラン、プルラン誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0047】親水性ポリマー層に代えて、親水性表面を有する紙やポリマー多孔質膜を用いることもできる。

【0048】親水性ポリマー層の厚さは、乾燥時に約1μm～約100μm、好ましくは約3μm～約50μm、特に好ましくは約5μm～約30μmであり、実質的に透明であることが好ましい。

【0049】親水性ポリマー層中には、目的とする反応を促進する、もしくは干渉、妨害反応を防止、低減するための各種試薬もしくは試薬の1部を含ませることができる。

【0050】水不透過性支持体としては、これまでドライケミストリー分析要素に使われている公知の水不透過性の支持体を用いることができる。具体的には、ポリエチレンテレフタレート、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、セルロースエステル（例えば、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、セルロースアセテートプロピオネート等）等から成る、厚さ約50μm～1mm、好ましくは約80μm～約300μmの透明フィルムを用いることができる。支持体は、通常光透過性のものを用いるが、展開層側から測定をする場合には、着色されていても、もしくは光不透過性であっても良い。支持体の表面には、必要により公知の下塗層もしくは接着層を設けて、親水性ポリマー層との接着を強固にすることができる。

【0051】本願発明においては、対象とする被検物質は特に限定されない。通常臨床検査の分野で測定される酵素、脂質、無機イオン、代謝産物、蛋白質等の他、各種グロブリン、免疫抗原、免疫抗体等の生体由来成分、薬物、ホルモン、腫瘍マーカー等、分析方法さえ確立していれば分析対象とすることができる。

【0052】本発明において使用する全血分析要素は、測定の対象となる項目もしくは検体によって、以下に記載する種々の構成を取ることができる。

【0053】1：水不透過性支持体／親水性ポリマー層／展開層／血球分離要素なる構成で被検物質と直接反応して化学変化を生じる試薬が含まれていない分析要素。Ca、GOT（グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ）、GPT（グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ）、γ-GTP（γ-グルタミルトランスペプチダーゼ）、グルコース、LDH（乳酸脱水素酵素）、

CPK（クレアチンホスホキナーゼ）、TP（総蛋白質）、Alb（アルブミン）、TCHO（総コレステロール）、UA（尿酸）、中性脂肪等の分析に有効である。

【0054】2：水不透過性支持体／親水性ポリマー層／展開層／血球分離要素なる構成で、親水性ポリマー層及び／又は展開層中に色原体を含むが、被検物質と直接反応して化学変化を生じる試薬が含まれていない分析要素。色原体としては、Ann. Clin. Biochem., 6, 24～27(1969)に記載の4-アミノアンチピリン(別名4-アミノフェナゾン、すなわち1-フェニル-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン)、特開昭59-54962等に記載の1-(2,4,6-トリクロロフェニル)-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン、1-(3,5-ジクロロフェニル)-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン等のトリ置換-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン、特公昭55-25840等に記載の1-フェニル-2,3-ジメチル-4-ジメチルアミノ-3-ピラゾリン-5-オン等の4-アミノアンチピリン類似体を用いることができる。これらの化合物のうちでは、4-アミノアンチピリン、1-(2,4,6-トリクロロフェニル)-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン、1-(3,5-ジクロロフェニル)-2,3-ジメチル-4-アミノ-3-ピラゾリン-5-オン等が好ましい。

【0055】3：水不透過性支持体／親水性ポリマー層／展開層／血球分離要素なる構成で、親水性ポリマー層及び／又は展開層中に、色原体及びその他の試薬（後述する、測定試薬を除く）を含む分析要素。その他の試薬としては、POD（ペルオキシダーゼ）、NAD（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）、NADP（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフوسفエート）、DIP（ジアフオラーゼ）等が挙げられる。

【0056】上記2及び3の構成において、色原体もしくはその他の試薬は、液体試料を供給・安定化後に供給することが可能だが、色原体の多くは水不溶性のため測定試薬とは別に供給する必要があること、これら色原体やその他試薬を層の中に初めから含ませて製造する方が再現性が良いこと等の利点がある。

【0057】4：媒染層を含む分析要素。呈色試薬がイオン性染料を形成する場合には、水不浸透性支持体と試薬層との間に媒染層を設けることができる。検体中の被検物質の量に比例して生成する色素を媒染層に移行・トラップすることにより、光学的な検出の効率を高めることができる。

【0058】例えば、呈色色素がカチオン性の染料を形成する場合には、媒染層として、高分子鎖に結合したアニオン原子もしくは原子団を含むポリマーを含有する親水性ポリマー層を、また呈色試薬がアニオン性の染料を形成する場合には、媒染層として高分子鎖に結合したカ

チオン原子もしくは原子団を含むポリマーを含有する親水性ポリマー層を用いることができる。

【0059】これらの媒染性ポリマーの詳細については、特公平2-30466、特開昭51-40191、同54-29700、同53-131089等に記載されている。

【0060】例えば、アニオン媒染性高分子としては、特公平2-30466号公報第13～第14欄に記載されているメチルビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体のアルカリ加水分解物、ポリスチレン-p-スルホン酸のアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩、スチレン-p-スルホン酸と親水性ビニルモノマーとの共重合体のアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩等が挙げられる。

【0061】更に、これらの高分子を含有させることのできる層等についても、同公報の第15～16欄に詳細な記載がある。

【0062】5：上記1～4の構成において、親水性ポリマー層と展開層の間に、光遮蔽層を設けた分析要素。光遮蔽層は光遮蔽性又は光遮蔽性と光反射性を兼ね備えた微粒子又は微粉末（以下、単に微粒子という）が少量の被膜形成能を有する親水性ポリマーバインダーに分散保持されている水透過性又は水浸透性の層である。光遮蔽層は検出可能な変化（色変化、発色等）を光透過性支持体側から反射測光する際に、供給された水性液体試料の色、特に全血試料に含まれるヘモグロビンの赤色等を遮蔽するとともに光反射層又は背景層としても機能する。

【0063】光遮蔽性と光反射性とを兼ね備えた微粒子の例として二酸化チタン微粒子（ルチル型、アナターゼ型又はブルカイト型の粒子径約0.1μmから約1.2μmの微結晶粒子等）、硫酸バリウム微粒子、アルミニウム微粒子又は微小フレイク等があり、光遮蔽性微粒子の例としてカーボンブラック、ガスブラック、カーボンマイクロビーズ等があり、これらのうちで二酸化チタン微粒子、硫酸バリウム微粒子が好ましい。

【0064】被膜形成能を有する親水性ポリマーバインダーとしては、前記親水性ポリマーのほかに弱親水性の再生セルロース、セルロースアセテート等があり、これらのうちではゼラチン、ゼラチン誘導体、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、マレイン酸共重合体等が好ましい。ゼラチン、ゼラチン誘導体は公知の硬化剤（架橋剤）を混合して用いることができる。

【0065】6：上記1～4の構成において、親水性ポリマー層と展開層の間に、水不浸透性で且つ気体透過性の層（以下、バリア層と称する）を設けた分析要素。反応によりアンモニアガスを発生するBUN（尿素窒素）、CRE（クレアチニン）、及びCO₂等の分析に有効である。全血・血漿のいずれも、検体として使用できる。

【0066】バリア層としては、特開昭52-3488に開示

された様なポリマーの塗布層、同58-77661に開示されたメンブランフィルター等を使用することができる。

【0067】ここで測定試薬とは、分析対象である被検物質と直接反応して化学変化を生ぜしめる試薬を指す。即ち、酵素が被検物質である場合にはその基質、被検物質が抗原（抗体）である場合には抗体（抗原）であり、被検物質が脂質、糖、代謝産物であって酵素によって検出可能な変化を生ずる化合物である場合にはその酵素である。また、これらの反応が酵素以外の化学試薬による一般の化学反応によって起こされる場合には該当する化学物質を言う。以下に具体例を挙げて説明する。

【0068】被検物質が酵素であるGOTの場合には、その基質であるアスパラギン酸とα-ケトグルタル酸、アミラーゼであれば高分子量の澱粉もしくは低分子量のオリゴサッカライド、GGTであればL-γ-グルタミルパラニトロアニリド、ALPであればパラニトロフェニルフォスフェート等である。

【0069】また、グルコースであればグルコースオキシダーゼ、尿酸であればウリカーゼ、コレステロールであればコレステロールエステラーゼもしくはコレステロールオキシダーゼ、中性脂肪であればリパーゼもしくはエステラーゼ、尿素であればウレアーゼ等である。

【0070】分析対象が蛋白質、アルブミン、Ca、無機リン等、被検物質と指示薬等とが直接反応して検出可能な変化を生ずる場合には指示薬を指す。

【0071】上記の反応系中に組み込まれる反応試薬が一部の酵素のように不安定なものである場合には、これらも測定試薬の中に含ませることが好ましい。

【0072】即ち、測定試薬溶液中に含めるべき試薬と、分析要素中に含めるべき試薬との分配に関しては、分析性能や保存安定性を指標として様々に変えることができる。分析対象が一つであっても、検出反応系組立によって上記の分配が異なるのは勿論である。

【0073】測定試薬の中には、反応を安定に再現性良く進行させるために、pHやイオン強度を調節する、分析要素を構成する材料への拡散・浸透を良くする、含有する酵素等の不安定性を改善する、等の目的で各種試薬を含ませることができる。また、検出反応と競合する反応を阻害するための試薬を含ませることもできる。

【0074】この様な試薬としては、例えば、ビルビンオキシダーゼやアスコルビン酸オキシダーゼ等がある。更に、アイソザイム検出の為に特定の生物に由来する酵素を阻害する化合物、例えばP型アミラーゼの阻害剤等を含ませることができる。

【0075】更に全血測定では、ヘモグロビンのカタラーゼ活性の阻害剤として有効なNa₂Na₃等を添加することもできる。

【0076】本発明で使用する全血分析要素は、一辺約5mmから約30mmの正方形又はほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特開昭57-63452、特開昭54-156079、実

開昭6-142454、実開昭58-32350、特表昭58-501144等に記載のスライド枠等に収めて分析スライドとして用いるのが製造、包装、輸送、保存、測定操作等の点で好ましい。

【0077】上記のような全血分析要素にまず全血試料を供給する。特に、採血量そのものが $100\mu\text{l}$ 以下と微量である場合には、血漿移行促進液と全血とを均一に混合することが難しく、実際には希釈・混合によりかえって誤差を大きくしてしまう場合が多い。スライド上で全血検体と血漿移行促進液とを順次供給する方法は、非常に安定した結果を与えることが分かり本発明に至った。そこで、本発明では、全血を先にスライドに供給し、ただちに希釈を兼ねる血漿移行促進液を供給する手順による方法が最も安定した分析結果を与える。全血を供給後この血漿移行促進液を供給するまでの時間が長いと溶血が起こり易いので測定項目によっては、測定値に誤差を与え易くなる。全血試料の供給量は通常は $5\mu\text{l}$ 以上、好ましくは $10\mu\text{l}$ 以上、特に好ましくは $15\mu\text{l}$ 以上であり、上限は通常 $50\mu\text{l}$ 以下、好ましくは $40\mu\text{l}$ 以下、特に好ましくは $30\mu\text{l}$ 以下である。血漿移行促進液の供給量は、全血試料の供給量と関係しており、全血の0.5倍から10倍、好ましくは1倍から5倍、更に好ましくは1倍から3倍が適当である。

【0078】血漿移行促進液は血球成分を破壊、溶血させることのない生理的等膨液であることが必須であるが加えて全血試料中の血漿成分、特に被検物質を溶解希釈することができかつ分析に支障が現れる程変質しないものであればよい。例えば生理的食塩水またはこれにpH緩衝剤やアルブミンなどの親水性ポリマーを加えたものが好ましい。界面活性剤は一般に溶血を促進するので好ましくないが、溶血作用の低いものなら添加しても構わない。血漿移行促進液にはまた、保存中の検体を安定化作用を有する試薬（例えばグルタチオン）やヘパリン、EDTAなどの血液の凝固を阻害する作用を有する試薬、色素その他の試薬が予め添加されていてもかまわない。

【0079】本発明における血漿移行促進は、以下の方法で行う。まず、スライド上に全血試料を点着し、次に血漿移行促進液を点着する。この方法は、操作が簡単であるにもかかわらず、再現性も良く、血漿移行量も多く、安定した測定結果が得られる。これは、以下の理由によるものと考えられる。

【0080】全血試料は、血球分離要素を構成している多孔質膜中で平面方向に均一に拡散するが、液量が十分ではないので、血漿受容層への拡散は少ない。次に血漿移行促進液を点着すると、これもまず平面方向に広がり、次に下層（血漿受容層）に拡散する。この時、全血試料と血漿移行促進液は相互に混合されるが、下層への拡散距離が平面方向での拡散距離より短いので、先に点着された全血から遊離した血漿成分を含む液が血漿受容

層へ移行する。

【0081】一定量の全血試料と一定量の血漿移行促進液とを予め別の容器で混合し、その一部または全部をスライドに点着する方法では、静脈血のように採血量が多い場合には、希釈・混合の誤差も少なく確実な方法であり、ある程度の改良も得られる。しかし、 $10\sim 50\mu\text{l}$ 程度の微量の全血試料を2～5倍程度に希釈しようとする、微量の全血と微量の血漿移行促進液とを均一に混合することとなるが、全血は粘度が高く、泡立ち易いので、このような条件での希釈は非常に困難であり、誤差を大きくしてしまう。

【0082】血漿移行促進液に各種の試薬等を含有させることができる。この試薬には被検物質と選択的に反応する試薬、例えば被検物質が抗原抗体反応を行ないうる成分の場合の被検物質の抗体とか、被検物質が特定のDNAである場合のこのDNAに対して選択的な結合性を有するDNAプローブ、等を含む。上記の抗体やDNAプローブは担体粒子に結合させて使用することができる。例えば、抗体を凝集反応で使用されている動物赤血球、ポリスチレンラテックス、ゼラチン粒子等に結合させることによりこの抗体と特異反応する抗原を抗体に結合させて担体粒子とともに血球分離要素に残存除去することができる。すなわち、B/F分離を行なわせることができる。その際、さらに新たな血漿移行促進液を供給することによって結合（Bound）部分を洗浄することも可能である。また、DNAプローブを水溶性担体例えば、ターゲットDNAと相補の関係にあるDNAに結合させて使用することにより、ターゲットDNAを非拡散性とすることができるので、選択的に補集することができるので、その後の検出反応をきわめて効率良く行なうことができる。

【0083】本発明方法は、微量の全血検体を用いて複数の血漿成分を同時に測定する場合に特に有効である。このような目的の為に血漿受容要素が予め複数の反応領域に分割されている全血用分析要素を用いる。

【0084】このような分析要素作製方法の詳細は特願平5-30254号明細書に記載されている。

【0085】このような複数項目測定用の分析要素においては、全血から血球分離要素を通して放出され血漿受容要素に到達する血漿が血漿受容要素のできるだけ広い面積に均一に拡散、展開していることが望ましい。しかしながら微量な全血を分析要素に供給してもその量が少なく、分析要素の中心部にのみ浸透・拡散するだけで広く拡散することがない。

【0086】本発明方法により血漿移行促進液を追加供給することにより、例え全血試料の供給量は微量であっても、血漿成分を分析要素内に均一に拡散・展開させることができる。

【0087】具体的には、上記の例に従って作製された全血用分析要素に $15\mu\text{l}$ の全血を供給しても血漿受容

素に移行される血漿の量は中心部に直径数mmの展開円を形成する程度に過ぎないが、本発明方法に従い血漿移行促進液を45 μ l供給すれば、血漿受容要素上に移行、拡散する希釈された血漿は直径13mm程度の展開円を形成する。

【0088】従って、血漿受容要素を例えば4つの反応ゾーンに分割したとしても直径4mmの測定ビームで照射しても確実に照射面をカバーするに十分な面積に血漿が拡げられている。

【0089】希釈することにより単位面積当たりの移行血漿量は少なくなるので、反応の検出、測定に要する感度は無希釈の場合に比べて高い必要がある。しかしこの場合にも、別に詳述したように、移行血漿量はほぼ一定なので、血漿移行促進液量を大きくしても感度の低下と直線的に比例する訳ではない。

【0090】全血試料を希釈状態で血球分離要素に供給後血漿及び血漿移行促進液が血漿受容要素の多孔性展開層へ拡散して移行するのを待つ。その間は5秒～1分間程度である。

【0091】続いて、血漿受容要素を乾燥する。血球分離要素は通常は血漿受容要素の乾燥に入る前に除去されるが、場合によっては乾燥後測定試薬溶液供給直前に除去してもよいこともある。

【0092】乾燥は血漿成分、特に被検物質を変質させないで血漿移行促進液の液分を除去できればよく、加熱、減圧、送風、乾燥剤の使用など如何なる手段を用いることもできる。

【0093】この乾燥は実質的に一定条件下で行なうことが好ましい。具体的には、特願平2-90562号明細書(特開平3-289543号公報)の第25頁第9行～第28頁第6行、特に第27頁第13行～第28頁第6行の記載に従って行なうことができる。例えば、多孔性シートの周囲が覆われた囲いの中に置いた状態でインキュベートする方法がある。これにより、周囲の温度、湿度に影響されことなく一定の乾燥状態となる。

【0094】温度範囲は、好ましくは30～45℃である。インキュベーション中の温度変動は $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、更に好ましくは $\pm 1^{\circ}\text{C}$ である。

【0095】この様な一定条件のインキュベーションを行うのに適したインキュベータが実開平3-126499号公報に記載されている。即ち、血球分離要素を除去した分析要素を要素の収納部に設置した状態で加温手段にて加熱恒温に保持するインキュベータである。本公報では該分析要素の収納部の上部に該要素収納部を密閉することが可能で、かつ、着脱可能なカバーを設けられ、該カバーで要素収納部を密閉した際、要素収納部内方に生まれる空間の体積が、分析要素の体積とほぼ一致する様に設計されたインキュベータであることを必須要件としているが、本発明方法の実施に当たってはカバーにより密閉する必要はなく、上部は常に開放されていてかまわな

い。

【0096】一定温度の乾燥風を一定条件で吹き付けても同様に再現性の良い結果が得られるが、上記インキュベータに比べ高価となる欠点を有する。

【0097】本発明者は、この乾燥条件についてさらに検討を進めた結果、分析要素の乾燥は、乾燥剤の存在する密閉容器内で50℃以下で行なうことが好ましいことを見出した。具体的には、分析要素をファスナー付のビニール袋とか蓋付のプラスチック容器等に乾燥剤とともに封入して冷蔵庫、冷凍庫等に入れておく。点着後約1時間は約25℃以下に保つことが好ましい。乾燥剤は公知の吸湿剤の中から被検物質を実質的に変質させないものを適宜選択して用いればよいが、安全性、脱水能力等からゼオライト、シリカゲルが好ましく、ゼオライトがより好ましい。ゼオライト又はシリカゲル1g当たり分析要素を4～10枚程度乾燥できる。形態としては、1～3mm程度の顆粒状の粒子等を透湿性の良い袋、例えば和紙やポリエステル不織布で作製した袋、ナイロンメッシュ製の袋等に入れる。

【0098】乾燥時間は点着された液体試料の量、種類、乾燥剤の種類を量等によって異なるが、通例1～10時間程度、特に1～3時間程度で分析要素の水分の90%以上が乾燥剤により除去・脱水されるような条件が好ましい。この乾燥時間は温度によっても影響される。保存温度が高い程、即ち蒸気圧が高い程乾燥時間は短くて良い。また、冷蔵庫もしくは冷凍庫に放置して一度低温に保った後、1℃以上にして乾燥することもできる。この低温乾燥法は、被検物質が酵素の場合にその変性劣化を防止できるので特に有用である。

【0099】ここで、「乾燥」とは、該親水性ポリマー中で実質的に反応が進行しない、もしくは被検物質の劣化が進行しない、状態であれば良い。従って、分析対象によって異なり、例えば酵素を対象とする場合には、親水性ポリマー中の水分は20%以下、好ましくは10%以下、更に好ましくは5%以下であれば良い。

【0100】ここで、水分の%は、被検物質を含む水溶液を分析要素に点着した時の水分量を100とした時の比率である。

【0101】乾燥後、血球分離要素が剥離除去されている血漿受容要素に、分析すべき項目に対応した測定試薬溶液を供給して反応を起こさせる。この反応を、ドライケミストリーの分野で公知の方法(反射濃度測光、色変化、蛍光測定、発光測定等)で測定し、検体中に含まれる成分を定量する。

【0102】分析すべき項目に対応した測定試薬溶液としては、ウェットケミストリーで公知の試薬溶液を用いることができる。これらは、分析対象成分と反応して、主として光学的測定方法により検出できる変化、例えば色変化、発色(呈色)、蛍光、発光、紫外線領域における吸収波長の変化、混濁発生等の変化を生じさせる。

【0103】ドライケミストリーの測定法としては、通常反射光学系が用いられる。本発明の方法においても、分析要素の水不透過性支持体を通して測光する方法が最も適用範囲が広いが、検体が全血ではない場合や検体供給後に血球分離要素を除去して測定する場合等には、透過測光方式により測定することができる。

【0104】また、水不透過性支持体が不透明な場合には、支持体の反対側から測定することもできる。

【0105】

【作用】本発明方法においては、全血の一定量をスライド上に供給後血漿移行促進液を追加供給する手順を標準としている。このような順序でスライド上で希釈を行なう場合には、血漿受容層に移行する血漿の全量は始めに供給される全血の量によって一義的に規定されてしまう。従って血漿移行促進液量が全血中の血漿成分の全量を血漿受容層に移行させるのに十分な量以上であれば水*

脱イオンゼラチン	20 g
p-ノニルフェノキシポリグリンドール (平均10グリンドール単位含有)	1.5 g
ビス〔(ビニルスルホンメチルカルボニル)アミノ〕メタン	220mg

【0108】次にこの層の上に下記の成分から成る接着層を乾燥後の厚さが1μmになるように水溶液から塗布※し、乾燥させて接着層を形成した。

脱イオンゼラチン	4.0 g
p-ノニルフェノキシポリグリンドール (平均10グリンドール単位含有)	430mg

【0109】次に接着層の上に約30g/m²の割合で水を供給して全面をほぼ一様に湿潤させ、PET製ブロード織物布地221(厚さ約150μm、空隙体積9.8μL/m²)を軽く圧力をかけてラミネートして接着させ、乾燥させ★

ヒドロキシプロピルメチルセルロース
(メトキシ基28~30%、ヒドロキシプロピル基7~12%含有。2%水溶液での20℃での溶液粘度が50cps)

オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (平均10オキシエチレン単位含有)	27 g
水	964.3 g

【0111】1-2:血球分離要素の作製
50デニール相当のPET紡績糸を36ゲージ編みしたトリ☆

ポリエチレングリコール(平均分子量5万)	2.0 g
四硼酸ナトリウム	2.0 g
水	96 g

【0112】次に上記含浸済みトリコット編物布地211を80℃に加熱し、その表面に130℃に加熱し溶解したホットメルト型接着剤213を、グラビア印刷法によりグラビアローラーからの転写によりドット状に付着させた。グラビアローラーのドットパターンは、ドット直径0.3mmの円、ドットの中心間距離0.6mm、ドット面積率約20%であった。付着した接着剤の量は約2g/m²であった。次いで、接着剤213が転写された直後の高温の布地211の表面に、有効孔径3.0μm、厚さ140μm、空隙率約80%のセルロースアセテートメンブランフィルター212

*分を除去・乾燥後の血漿受容層中の血漿量は血漿移行促進液の量に関係なくほぼ一定となる。このような条件を満たす血漿移行促進液の必要最小量はスライドの構成・供給全血の量・血漿移行促進液の組成に依存するが最適化された場合全血量のおよそ倍量であることが実験的に確かめられた。

【0106】

【実施例】

実施例1

1. 多層分析スライドの作製

1-1:血漿受容要素の作製

ゼラチン下塗りされている厚さ180μmのポリエチレンテレフタレート(PET)無色透明平滑シート223の上に下記の成分から成る吸水層222を乾燥後の厚さが15μmになるように塗布し、乾燥した。

【0107】

※し、乾燥させて接着層を形成した。

★た。

【0110】次にこの布に下記の組成の水溶液を100mL/m²の割合でほぼ一様に塗布し、乾燥させて血漿受容要素22シートを完成させた。

☆コット編物布地211(厚さ約250μm)に、下記組成の水溶液を含浸し、乾燥させた。

の非光沢面を向かい合わせてラミネートローラーの間を通し、両者をラミネートして接着一体化(部分接着)した。セルロースアセテートメンブランフィルターの光沢面側にホットメルト型接着剤214をグラビアローラーを用いて同様に付着させ、その上に表面にシリコンを塗布してある離型紙216を積層して、血球分離要素21シートを作製した。

【0113】1-3:単項目測定用乾式分析スライドの作製

1-2で作製した血漿受容要素を15mm×15mmの大きさの

フィルムチップに打ち抜いた。

【0114】この血漿受容要素22チップをスライド枠10の下蓋部分12に収容した。この下蓋部分12はハイインパクトポリスチレン製で、縦28mm、横24mm、厚さ1.2mmの大きさをしており、縦横16mm、深さ0.8mmの血漿受容要素チップ収容部121とその中央に直径13mmの円孔122が形成されている。下蓋部分12の4隅にホットメルトディスペンサー30でホットメルト型接着剤225を点着し、血漿受容要素22チップを入れて、4隅に1mm×1mmの大きさの突起のある超音波ホーン31（ブランソン社製）で熱溶融接着した。

【0115】一方、図3の右上部に示されている血球分離要素21シートも15mm×15mmの正方形チップに切断した。スライド枠の下蓋部分12と同形の上蓋部分11の4隅にホットメルトディスペンサー30でホットメルト型接着剤215を点着し、血球分離要素21チップを入れて超音波ホーン31で熱溶融接着した。

【0116】血球分離要素21の離型紙216を剥離してスライド枠10の下蓋部分12に収容固定されている血漿受容要素22に合わせ、超音波ホーン32で加熱して血球分離要素21の光沢面にドット状に点着しておいたホットメルト型接着剤214で両要素21、22を接着させた。

【0117】1-4：4項目測定用乾式分析要素の作製
上記の血漿受容要素シート及び血球分離要素シートを用いて図3に示す手順に従って図1及び図2に示す乾式分析要素を作製した。

【0118】まず、図3左上部に示すように、血漿受容要素22シートに刃角が60度で480℃に加熱された熱溶断刃で支持体223に達する熱溶断溝224を15mm巾で縦横に、すなわち格子状に形成した。この熱溶断溝224は開口部の巾が0.8mm、深さが0.19mmであった。次いで、この格子間の中央部をカッターで縦横に切断し、十字状の熱溶断溝224で4つの等しい正方形に仕切った15mm×15mmの血漿受容要素22チップを作製した。

【0119】この血漿受容要素22チップをスライド枠10の下蓋部分12に収容した。この下蓋部分12はハイインパクトポリスチレン製で、縦28mm、横24mm、厚さ1.2mmの大きさをしており、縦横16mm、深さ0.8mmの血漿受容要素チップ収容部121とその中央に直径13mmの円孔122が形成されている。下蓋部分12の4隅にホットメルトディスペンサー30でホットメルト型接着剤225を点着し、血漿受容要素22チップを入れて、4隅に1mm×1mmの大きさ

① BUN用測定試薬

Triton-X 100(ローム アント ハース社製)	2 g
o-フタルアルデヒド	2 g
N-1-ナフチル-N'-ジエチルエチレンジアミン蔭酸	820mg
蒸留水	10ml

【0128】

② GOT

トリスヒドロキシエチルアミノメタン	84mg
-------------------	------

の突起のある超音波ホーン31（ブランソン社製）で熱溶融接着した。

【0120】一方、図3の右上部に示されている血球分離要素21シートも15mm×15mmの正方形チップに切断した。スライド枠の下蓋部分12と同形の上蓋部分11の4隅にホットメルトディスペンサー30でホットメルト型接着剤215を点着し、血球分離要素21チップを入れて超音波ホーン31で熱溶融接着した。

【0121】血球分離要素21の離型紙216を剥離してスライド枠10の下蓋部分12に収容固定されている血漿受容要素22に合わせ、超音波ホーン32で加熱して血球分離要素21の光沢面にドット状に点着しておいたホットメルト型接着剤214で両要素21、22を接着させた。超音波ホーン32の受台33には熱溶断溝224に対応する部分に十字状の溝331が形成されている。この溝331は巾2mm、深さ2mmである。

【0122】こうして図1及び図2に示すスライド枠10に収容された乾式分析要素20を作製した。

【0123】2. 測定

2-1：検体の調整

ヘパリン入り健康者全血20mlを遠心分離し血球成分と血漿成分に分離した。血漿成分の一部を成分濃度既知のコントロール血清（富士ドライケムコントロールLH）と置換した。血球成分とコントロール血清で置換した血漿とを混合することにより成分濃度の調整された全血を再構成した。

【0124】2-2：検体の点着

1-3で作製した多層分析スライドの上に検量線作製用に2-1で調製した全血をそれぞれ30μlずつ点着し、室温で30秒放置後ピンセットにて血球分離要素を血漿受容要素から剥離除去した。

【0125】2-3：脱水乾燥

2-2で得たスライドを、和紙で作られた透湿性の袋に入れた粒径約1mmの顆粒状ゼオライト2gと共に5cm×7cmの防湿性ポリエチレンの小袋に入れ、密封して室温にて3時間保存した。

【0126】2-4：検出試薬の点着と測定

下記処方からなる尿素窒素（BUN）及びグルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）の各測定試薬溶液を調製した。

【0127】

21	22
燐酸・1カリウム・2水素	104mg
L-アスパラギン酸	431mg
α -ケトグルタル酸	93mg
20% MgCl ₂	273 μ l
POD	343 IU
TPP (コカルボキシラーゼ)	21mg
FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド)	5mg
オキサロ酢酸デヒドラーゼ	24U
POPG (ピルビン酸オキシダーゼ)	3088U
2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-5-フェネチルイミダゾール	54mg

【0129】

③ グルコース (GLU) 測定試薬

グルコースオキシダーゼ	2000U
ペルオキシダーゼ	1200U
0.1M MES バッファー (pH5.7)	10ml
Triton X-100	10 μ l
NaN ₃	20mg

【0130】

④ 総蛋白 (TP) 測定試薬

20mlの水に下記組成の試薬を溶解し、ビウレット反応を利用した測定試薬液を調製した。

硫酸銅	3.5g
酒石酸 (5水塩)	2.3g
水酸化リチウム	3.8g
セチルメチルアンモニウムブロマイド	0.1g
1N NaOH	3.4ml
蒸留水	6.6ml

【0131】2-3に記した乾燥後の4分割スライドの区画No. 1、2、3、4にそれぞれGLU (グルコース)、TP (総蛋白)、BUN及びGOTの検出試薬溶液の各5 μ lを点着した。この際、スライドの展開層を仕切る溝の断面は完全に溶着しており、試薬溶液が滲み出すことは無かった。また、吸水層からの液の滲み出しも無かった。

【0132】スライドを37℃で6分間インキュベートし、測光ビームヘッドを調整してビーム径を3mmに絞った富士ドライケム3000アナライザーを用いて、それぞれの発色に相当する波長 (GLU: 510nm、TP: 540nm、BUN: 625nm、GOT: 650nm) で反射光学濃度を測定した。同様の操作を全血検体No. 1～No. 4についてそれぞれ3回づつ繰り返した。

【0133】2-5: 検量線の作成

2-1で得たNo. 1～No. 4の全血から分離して得た血漿についての日立7150によるBUNの濃度値を横軸に、2-4で得た本法によるNo. 1～No. 4の全血について

の測定値を縦軸にプロットし、図5に示すような検量線を作成した。同様に、GLU、TPについてもそれぞれ検量線を作成した。

【0134】また、GOTについても図6に示すような検量線を作成した。但し、GOTについては、反応速度を6分目の反射光学濃度から1分目の反射光学濃度を差し引いて求めてプロットした。

【0135】2-6: 同時再現性

別の健常者より得たヘパリン入り静脈全血を2つに分け、2-1と同様に成分濃度を变化させNo. 5～No. 6の検体を得た。それぞれの検体について、6回繰り返し測定を行った。2-5で得た検量線を用いてGLU、TP、BUNの濃度及びGOTの活性値を算出した。結果は表1～4の通りであった。臨床診断上十分な定量性を有していることが確認された。

【0136】

【表1】

GLU (mg/dl)

検体 レベル	無希釈 60 μ l		毎回希釈 (w30+s30)	
	L	H	L	H
1	52	334	60	370
2	74	356	65	354
3	63	368	60	381
4	65	338	67	349
5	55	336	62	392
6	76	332	73	369
X	64.4	343.9	64.6	369.0
SD	9.4	14.6	4.8	16.0
CV (%)	14.7	4.2	7.5	4.3

【0137】

【表2】

BUN (mg/dl)

検体 レベル	無希釈 60 μ l		毎回希釈 (w30+s30)	
	L	H	L	H
1	19	67	14	76
2	18	76	17	73
3	18	83	17	80
4	16	77	16	78
5	16	82	16	75
6	16	78	15	82
X	17.1	77.0	15.7	77.2
SD	1.47	5.7	1.12	3.18
CV (%)	8.60	7.4	7.13	4.12

【0138】

【表3】

TP

検体 レベル	無希釈 60 μ l		毎回希釈 (w30+s30)	
	L	H	L	H
1	4	7	3	7
2	4	7	4	7
3	4	7	3	6
4	4	6	4	6
5	4	7		6
6	4	7		7
X	3.9	7.0	3.5	6.4
SD	0.1	0.4	0.4	0.5
CV (%)	3.4	5.3	10.0	8.3

【0139】

【表4】

GOT (V/l)

検体 レベル	無希釈 60 μ l		毎回希釈 (w30+s30)	
	L	H	L	H
1	24	140	23	157
2	18	129	24	130
3	31	142	31	129
4	31	132	17	134
5	23	140	19	133
6	16		30	
X	23.9	136.6	23.9	136.6
SD	6.2	5.9	5.8	11.5
CV (%)	25.9	4.3	24.1	8.4

【0140】2-7:ヘマトクリット依存性

①検体の調製

健康者より得たヘパリン入り全血を弱い条件で遠心分離

し、血球成分と血漿成分とに分けた後、それぞれの混合比を変えて再構成することにより、ヘマトクリット値の異なる全血検体No. 7~No. 10を得た。それぞれについて

て、ヘマトクリット値をキャブラリー遠心法により求めた。また成分濃度が異なる検体4種類を調製した。

【0141】②測定

2-1~2-4の手順に従って上記検体について、BUN及びGOTの値を測定した。またこれとは別に、血漿移行促進液を全く使わずに全血検体No. 7~No. 14につ*

*いて、60 μ l点着した場合についても測定した。横軸にヘマトクリット値を縦軸に測定値をプロットして表5 (BUN) 及び表6 (GOT) を得た。

【0142】

【表5】

			単 位	H c t			
				19	32	41	58
B U N	正 常 値 域	無 希 釈 法	mg/dl	16	13	14	10
			%	114	93	100	71
	2 段 希 釈 法		mg/dl	15	14	14	13
			%	107	100	100	86
	高 濃 度 域	無 希 釈 法	mg/dl	81	78	74	32
			%	109	105	100	43
	2 段 希 釈 法		mg/dl	77	80	74	61
			%	104	109	100	82

【0143】

【表6】

			単 位	H c t			
				28	36	43	57
G O T	正 常 値 域	無 希 釈 法	u/L	19	18	18	11
			%	106	100	100	61
	2 段 希 釈 法 (本発明)		u/L	18	19	19	17
			%	95	100	100	89
	中 濃 度 域	無 希 釈 法	u/L	136	132	127	53
			%	107	104	100	42
	2 段 希 釈 法		u/L	134	124	127	104
			%	105	98	100	82

【0144】表5、6から明らかなように、無希釈全血ではヘマトクリットが50%を越えると測定値が急激に低下するのに対して、本法に従ってスライド上で希釈した場合には、測定値は全て $\pm 20\%$ の範囲に入っており、ヘマトクリット依存性が大幅に低減されていることが確かめられた。

【0145】実施例2

実施例1と同様にして作製したGOTとBUNを測定する2項目スライドに30 μ l全血を点着し、続いて30 μ lの血漿移行促進液を点着し、35℃で10分間脱水乾燥した後、それぞれの項目に対応する測定試薬を点着し、富士ドライケムアナライザー3000で測光した時の反射光学濃度を調べた。GOTは酵素活性を測定するために測定試薬を点着5分後の値から1分後の値を差し引いたレート測光値、BUNは6分後の測光値 (エンドポイント) ※

※である。比較例として、通常の方法に従って、全血60 μ lをスライドに点着し、同様の測定を行った場合の結果を示した。

【0146】用いた検体はヘパリン共存下に採血した静脈血に、BUNとGOTを添加し、濃度を調節した。添加前後の検体について1部を遠心分離して血漿を得て、その血漿について臨床検査自動測定機 (日立7150) を用いて、それぞれの濃度レベルを求めた。結果は表7の通りである。点着液量は比較例の半分であるにも拘らず、得られた光学濃度は2倍から2.4倍であった。このことは本発明方法によれば全血からの血漿の移行効率が2倍以上になっていることを示すものである。

【0147】

【表7】

全血点着量	本 発 明 方 法				比 較 例			
	30 μ l				60 μ l			
項 目	G O T		B U N		G O T		B U N	
濃度レベル	u/L	u/L	mg/dl	mg/dl	u/L	u/L	mg/dl	mg/dl
OD ₅	0.0321	0.0876	0.4498	0.5533	0.0271	0.0829	0.4390	0.5533
全血10 μ l 当たりの OD ₅	0.0107	0.0292	0.1499	0.1844	0.0045	0.0138	0.0732	0.0822
相 対 値 (%)	238	217	205	200	100	100	100	100

【0148】実施例3

実施例1と同様の実験において、分析要素が、分割されていない、単項目測定スライドを用いた。血球分離膜を

剥離、除去した後35℃で10分間脱水乾燥した後BUN測定試薬10 μ lを点着し、富士ドライケムアナライザー5500で6分後の反射光学濃度を測定し、検量線を用いてB

UN濃度を算出した。

【0149】図7-Aは検体として無希釈全血を点着した場合、図7-Bは2段希釈法により $30\mu\text{l}$ の全血と $30\mu\text{l}$ の血漿移行促進液とを続けて点着した場合である。図に見られるように2段希釈法によれば、ヘマトクリット依存性が大幅に改善される。

【0150】実施例4

実施例1と同様の実験に於いて、始めに点着する全血の量は $30\mu\text{l}$ に固定しておいて、次に点着する血漿移行促進液の量を $15\mu\text{l}$ から $40\mu\text{l}$ まで変化させた場合について調べた。図8のAはBUNを測定した時の全液量を横軸、測定値を縦軸とした時の結果である。

【0151】鎖線は平均値を中心として、 $\pm 6\%$ の範囲を示したものである。図に見られるように血漿移行促進液量が $15\sim 30\mu\text{l}$ すなわち全液量が $45\sim 60\mu\text{l}$ の範囲ではほぼ一定の測定結果が得られている。

【0152】図8のBは全血の量を $15\mu\text{l}$ とし、血漿移行促進液量を $30\mu\text{l}$ から $50\mu\text{l}$ まで変化させた場合であるが、この場合には全濃度域にわたって、ほぼ一定の測定結果が得られた。

【0153】

【発明の効果】本発明の方法により、全血測定用検体乾燥型多層分析スライドへの全血検体の供給量を大幅に少なくすることができるので、微量全血での測定が可能になる。特に多項目測定の場合に有利になる。また、希釈することにより、高いヘマトクリットの血液検体でも粘性が大幅に低下するので、全血測定で一番大きな問題であるヘマトクリット依存性を大幅に改善できる。通常測定では検体を希釈すれば、測定時の検出感度が低下するが本法では、血漿移行促進液を一度脱水乾燥するので、感度低下は起こらない。逆に血漿の移行量が増加するので、無希釈全血での測定よりも感度的には有利になる。通常的方式では希釈率のバラツキが直接測定結果のバラツキに影響するが、本方式では、一度乾燥してしまうので検体量が一定であれば希釈倍率がそのものの影響は本質的に受けにくい。血漿移行促進液に分析を有利にするような試薬を添加しておくことにより影響因子を抑制することができるので、より信頼性の高い結果を得ることができる。例えば、コレステロールの分画試薬を添加しておけば、全血を用いたHDL-コレステロールの測定が可能になる。さらに、血漿移行促進液中に被検物質に対する抗体や対応するプローブを担持させて組み込んでおけば、多孔質中でのBF分離が可能になるので、免疫測定やDNA測定が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 スライド材に収容された本発明の一実施例である乾式分析要素の断面図である。

【図2】 同乾式分析要素の平面図である。

【図3】 図1の分析要素の作製工程図である。

【図4】 図1の分析要素の使用方法を示す工程図である。

【図5】 本発明の実施例1で得たBUNの検量線である。

10 【図6】 本発明の実施例1で得たGOTの検量線である。

【図7】 本発明の実施例3で得た、全血試料のヘマトクリット値とBUNの分析値の関係を無希釈法で行なった場合と2段希釈法で行なった場合を比較するグラフである。

【図8】 本発明の実施例4で得た、血漿移行促進液量を変えてBUN分析値の変化を調べた結果を示すグラフである。

【符号の説明】

20 10…スライド枠

11…上蓋部分

12…下蓋部分

121…血漿受容要素チップ収容部

122…円孔

20…乾式分析要素

21…血球分離要素

211…繊維質多孔性層

212…非繊維質多孔性層

213…部分接着層

30 214…部分接着層

215…ホットメルト接着剤

216…離型紙

22…血漿受容要素

221…多孔性展開層

222…親水性ポリマー層

223…水不透過性支持体

224…熱溶断溝

225…ホットメルト接着剤

30…ホットメルトディスペンサー

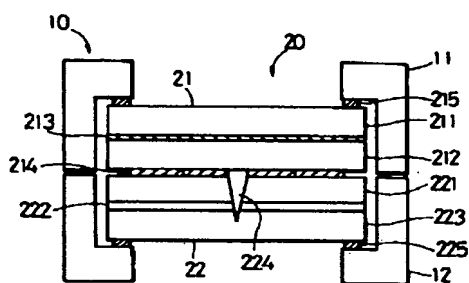
40 31…超音波ホーン

32…超音波ホーン

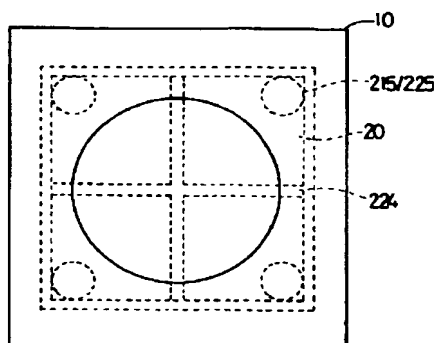
33…受台

331…溝

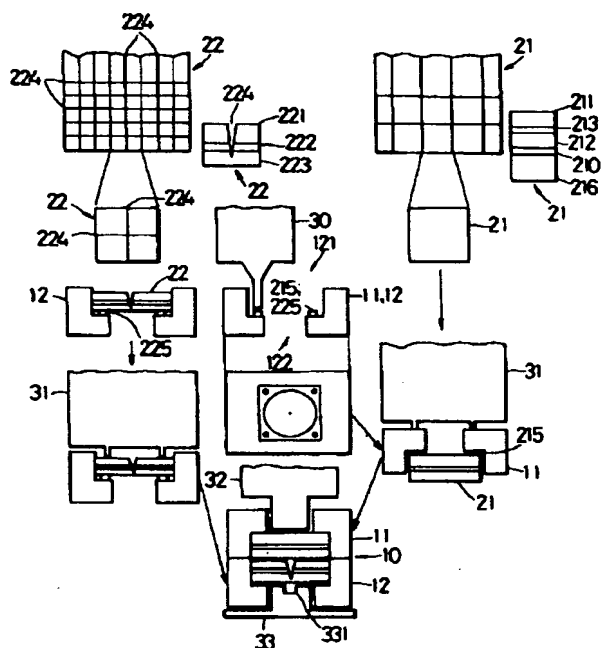
【図1】



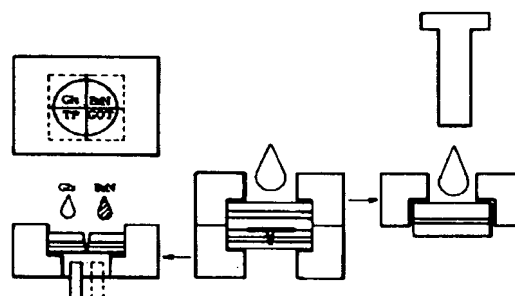
【図2】



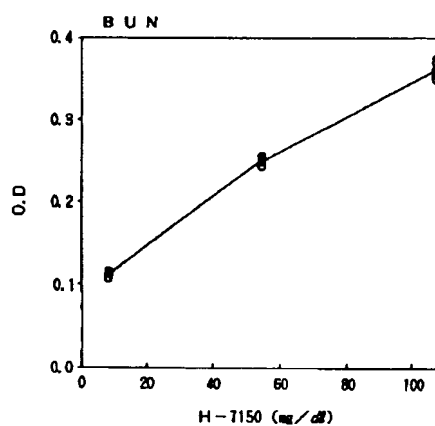
【図3】



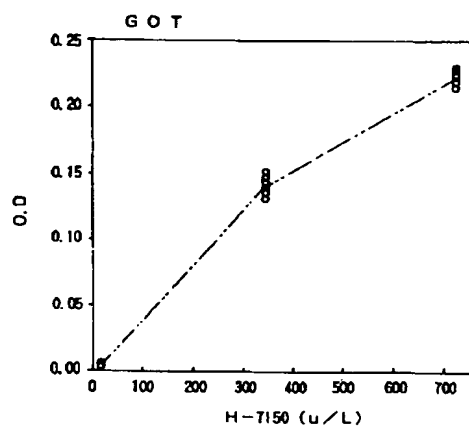
【図4】



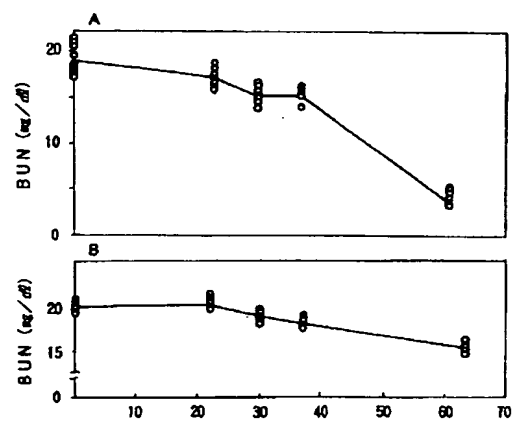
【図5】



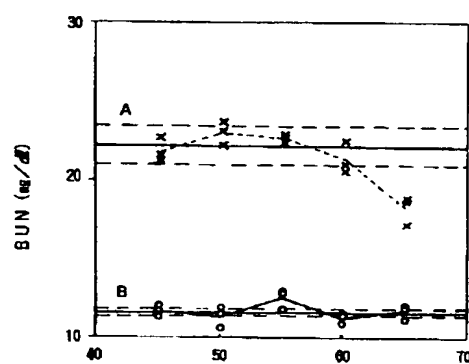
【図6】



【図7】



【図8】



全液量 (μL)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)